

**DETEKSI *Escherichia coli* O157:H7 DARI SUSU DAN DAGING
MENGUNAKAN SERUM KEBAL MONOSPESIFIK**

DETECTION *Escherichia coli* O157:H7 FROM MILK AND MEAT
USING MONOSPECIFIC IMMUNE SERUM

Widodo Suwito¹

¹Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta
E-mail: widodo.suwito@yahoo.com.

ABSTRACT

Escherichia coli O157:H7 is one of the bacterial causing borne food disease in human. Monospecific immune serum against somatic (O) and flagella (H) antigens have been used to detect *E.coli* O157:H7. The aim of this study was to detect of *E.coli* O157:H7 using immune serum monospecific by absorption and coagglutination tests. Monospecific immune serum was obtained by injecting *E.coli* O157:H7 into New Zealand White rabbits. Serum was harvested and absorbed with somatic *E.coli* heterologous antigen until no agglutination was observed. The result shows that immune serum monospecific can be used to detect of *E.coli* O157:H7 in milk and meat.

Key words: immune serum, monospecific, *E.coli* O157:H7.

ABSTRAK

Escherichia coli O157:H7 merupakan salah satu bakteri patogen penyebab *food borne disease* pada manusia. Deteksi *E.coli* O157:H7 pada serum kebal monospesifik berdasarkan somatik antigen (O) dan flagella (H). Tujuan dari penelitian ini untuk mendeteksi *E.coli* O157:H7 menggunakan serum kebal monospesifik dengan cara absorpsi dan uji koaglutinasi. Serum kebal monospesifik diperoleh dengan cara menyuntikkan antigen *E.coli* O157:H7 pada kelinci jenis *New Zealand White*. Serum dikoleksi dan diabsorpsi menggunakan antigen somatik *E.coli* heterolog sampai tidak terjadi reaksi agglutinasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan serum kebal monospesifik dapat digunakan untuk mendeteksi *E.coli* O157:H7 dalam susu dan daging.

Kata kunci: serum kebal, monospesifik, *E.coli* O157:H7

PENDAHULUAN

Escherichia coli O157:H7 merupakan strain patogenik yang dapat mengkontaminasi pangan terutama asal ternak. Pada manusia, *Escherichia coli* O157:H7 menyebabkan *hemorrhagic colitis* (HC), *hemolytic uremic syndrome* (HUS) dan *thrombocytopenia purpura* (TPP) (AAPHV, 2000 ;

Chinyu dan Brandt, 1995).

Pada tahun 1997 di Amerika Serikat dilaporkan *Escherichia coli* O157:H7 merupakan penyebab penyakit asal makanan yang ke dua setelah *Salmonella sp* dengan jumlah 3260 kasus dan 8 orang meninggal dunia (CDC, 1997). Pada tahun 1996 di Skotlandia dilaporkan sebanyak 496 wabah dari 7500 kasus dan 21 orang meninggal dunia,

sedangkan di Inggris sebanyak 30 wabah dari 656 kasus dengan 11 orang meninggal dunia (SCIEH, 2001).

Penyakit asal makanan sering terjadi di Indonesia. Pada bulan September 2004 terjadi keracunan pada 72 siswa Sekolah Dasar (SD) di Tulung Agung Jawa Timur setelah minum susu, 300 siswa SD di Bandung dan 73 karyawan Carefour di Surabaya. Menurut Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) kasus tersebut disebabkan oleh *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (KOMPAS, 4 September 2004).

Escherichia coli O157:H7 merupakan salah satu penyebab keracunan pangan asal ternak. Salah satu upaya untuk mendeteksi *Escherichia coli* O157:H7 dapat menggunakan serum kebal monospesifik. Serum kebal monospesifik yaitu antiserum yang tidak bereaksi silang dengan tipe antigen lainnya atau hanya mengenal antigen homolognya. Serum kebal monospesifik dapat diperoleh dengan cara absorpsi (Pasaribu, 1985; Wibawan dan Pasaribu, 1993). Tujuan dari penelitian ini untuk mendeteksi *Escherichia coli* O157:H7 dalam susu dan daging dengan menggunakan serum kebal monospesifik.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 8 ekor kelinci jantan jenis *New Zealand White* umur kurang lebih 1 tahun. Kelinci dipelihara secara terpisah dalam kandang ukuran 30 cm x 60 cm. Sebelum perlakuan semua kelinci diadaptasikan selama 1 minggu diberi pakan wortel, kangkung dan rumput serta minum *ad libidum*.

Antigen yang digunakan adalah *Escherichia coli* O157:H7 isolat lokal dan *Escherichia coli* O157:H7

ATCC 43894, sedangkan penyiapan antigen O157 dan H7 mengikuti petunjuk (Supar, 1985).

Kelinci dibagi menjadi 4 kelompok yaitu: 2 ekor diinjeksi dengan antigen O157 isolat lokal, 2 ekor diinjeksi dengan antigen H7 isolat lokal, 2 ekor diinjeksi dengan antigen O157 ATCC 43894 dan 2 ekor diinjeksi dengan antigen H7 ATCC 43894. Tiap-tiap kelinci diinjeksi secara intra vena dengan dosis bertingkat 0,25 ml, 0,5 ml, 1,5 ml dan 2 ml dengan kepekatan antigen masing-masing setara dengan larutan Mac Farland no 1, 2, 3 dan 5. Satu minggu setelah injeksi terakhir kelinci diambil darahnya, kemudian serum dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C sampai uji lebih lanjut.

Pembuatan serum kebal monospesifik O157 dan H7 mengikuti petunjuk (Supar, 1985) yang dimodifikasi dari metode Sokja (1965). *Escherichia coli* yang digunakan untuk absorpsi ditumbuhkan pada *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid) dalam botol *Roux* kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Sel di inaktifkan menggunakan formalin 0,1% dan dipanen dengan *Ose* steril. Suspensi sel disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit, kemudian endapan dicuci 3 kali dengan NaCl fisiologis. Setiap campuran sel dari 3 botol *Roux* dimasukkan 5 ml antiserum O157 yang akan diabsorpsi, dikocok dengan *vortex mixer* selama 1-5 menit, kemudian di simpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Campuran antiserum dan sel yang dipakai untuk mengabsorpsi disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Supernatan (antiserum O157) diuji dengan antigen somatik O heterolog sampai menimbulkan reaksi aglutinasi negatif.

Antiserum H7 yang telah dipanen diabsorpsi dengan antigen *whole cell Escherichia coli* O157:H7 yang diautoclave pada suhu 121°C selama satu jam.

Cara absorpsi untuk mendapatkan antiserum H7 monospesifik sama seperti pada proses absorpsi untuk mendapatkan antiserum O157 monospesifik, yang berbeda hanya cara menyiapkan antigen untuk absorpsi.

Uji koaglutinasi dilakukan mengikuti petunjuk (Honda dkk., 1983 dan Murray 1987). Secara singkat *S.aureus* Cowan I ditumbuhkan pada media NA dalam botol Roux kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Ke dalam botol Roux dimasukkan 10 ml *Pospat Bufer Saline* (PBS) yang mengandung 0,5% formalin, didiamkan selama 5-7 menit kemudian sel bakteri dipanen dengan *Ose* steril. Sel disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit. Endapan sel dicuci 3 kali dengan PBS dan disentrifus seperti sebelumnya. Endapan sel dari pencucian terakhir disuspensikan dalam PBS dan didiamkan selama 3 jam pada suhu kamar sambil setiap kali dikocok dengan hati-hati. Setelah pencucian terakhir sel disuspensikan dalam PBS dan konsentrasi sel dibuat 10% (volume endapan sel/volume PBS).

Suspensi sel kemudian dipanaskan dalam waterbath suhu 80°C selama 1 jam. Setelah dingin endapan sel dicuci 3 kali dan endapan dari pencucian terakhir dilarutkan dalam PBS dengan konsentrasi dibuat 10%. Sebanyak 1 ml suspensi sel 10% (protein A) ditambah 0,1 ml serum kebal monospesifik O157 dan H7 selanjutnya dikocok pelan-pelan, kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 3 jam dan setiap jam dikocok pelan-pelan dan reagen siap digunakan (Honda dkk, 1983 dan Murray 1987).

Pada penelitian ini telah tersedia isolat *Escherichia coli* dari koleksi pribadi terdiri dari 351 isolat dari susu dan 30 isolat dari daging. *Escherichia*

coli diperbanyak dalam media *Plate NA* (Oxoid) kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian dipanen menggunakan *Ose* steril dan dimasukkan dalam 5 ml NaCl fisiologis selanjutnya diautoclave pada suhu 121°C selama 1 jam, sedangkan untuk H *serotyping* tidak dilakukan autoclave. Sebanyak 5 µl antigen dicampur 8 µl serum kebal monospesifik di atas obyek gelas, bila terjadi aglutinasi dalam waktu 1-3 menit menunjukkan serotipe yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan antigen O157 dan H7 adalah tahapan awal yang sangat penting dalam pembuatan serum kebal monospesifik. Pada tahapan ini dilakukan dengan menyiapkan antigen O157 yang berasal dari *Escherichia coli* O157:H7 isolat lokal dan ATCC 43894 sehingga dapat digunakan sebagai pembanding. Konsentrasi antigen yang dipersiapkan dilakukan dengan cara semikuantitatif yaitu menyamakan kekeruhannya dengan standar larutan Mac Farland no 1, 2, 3 dan 5. Tujuan penyiapan antigen O157 dilakukan autoclave pada suhu 121°C selama 1 jam untuk menghilangkan flagella sehingga yang tersisa hanya somatik antigen (O), sedangkan penyiapan antigen H7 tidak dilakukan autoclave.

Setiap kelinci diinjeksi secara intra vena dengan dosis bertingkat 0,25 ml, 0,5 ml, 1,5 ml dan 2 ml dengan kepekatan antigen masing-masing setara dengan larutan Mac Farland no 1, 2, 3 dan 5. Suntikkan antigen diberikan secara intra vena dengan tujuan antigen cepat diabsorpsi sehingga kelinci cepat dirangsang untuk menghasilkan antibodi terhadap antigen tersebut.

Pemberian suntikan antigen dengan dosis bertingkat akan menyebabkan sel limfosit B dirangsang sehingga antibodi yang dihasilkan makin lama makin meningkat. Tubuh kelinci terdapat sel limfosit B yang menghasilkan protein spesifik yang beredar didalam tubuh dan disebut dengan antibodi atau imunoglobulin (Ig) (Tizard, 1998). Bila zat asing yang bermolekul besar seperti protein dan polisakarida masuk ke dalam tubuh, maka akan dihasilkan antibodi terhadap antigen tersebut. Imunoglobulin (Ig) mempunyai daerah pengikatan atau *binding site* yang spesifik terhadap suatu dererminan pada antigen. Sumber antibodi yang paling umum adalah serum. Kelinci jenis *New Zealand White* sering digunakan dalam pembuatan serum kebal monospesifik karena serum yang diambil dari kelinci telah menjadi standar prosedur khususnya di laboratorium (Herbst dkk, 1983). Disamping itu darah kelinci sangat intensif untuk produksi antiserum (Malole dan Pramono, 1989).

Satu minggu setelah suntikan antigen terakhir semua kelinci dibunuh dan dipanen serumnya, kemudian diuji dengan antigen *Escherichia coli* O157:H7 di *autoclave* dan tidak di *autoclave*. Dari uji coba tersebut semuanya menunjukkan reaksi positif. Hal ini menunjukkan bahwa serum yang dihasilkan belum murni, karena antigen yang paling murni sekalipun masih mengandung lebih dari satu determinan (Dewi, 1984). Suntikan antigen yang telah murni pada kelinci masih dihasilkan antibodi poliklonal yang terdiri dari berbagai macam antibodi yang mempunyai *binding site* berbeda-beda (Sofyan, 1992).

Antiserum yang belum monospesifik dilakukan absorpsi menggunakan antigen somatik *Escherichia coli* heterolog seperti : O8, O9, O20, O64, O101,

O138 dan O149. Serum yang telah diabsorpsi dicampur dengan somatik antigen yang homolog terjadi agglutinas, sedangkan dengan antigen yang heterolog tidak terjadi agglutinas, maka serum tersebut dikatakan telah monospesifik O157. Antiserum H7 monospesifik diabsorpsi dengan antigen *Escherichia coli* heterolog seperti : O8, O9, O20, O64, O101, O138 dan O149 tetapi dalam penyiapan antigen tidak dilakukan proses *autoclave*. Serum yang telah diabsorpsi dicampur dengan flagella antigen yang homolog terjadi agglutinas, sedangkan dengan antigen flagella heterolog tidak terjadi agglutinas, maka serum tersebut telah monospesifik H7. Serum dapat mempunyai spesifitas monospesifik dengan cara mengabsorpsi serum yang belum monospesifik dengan sel bakteri utuh (*whole cell*) yang menunjukkan reaksi silang non spesifik dengan serum yang bersangkutan (Wibawan dkk., 1993).

Uji koaglutinasi berdasarkan komponen protein A (yang dimiliki oleh *S.aureus* Cowan I) yang berikatan dengan reseptor suatu antibodi. Suspensi *S.aureus* Cowan I yang ditambahkan antiserum yang telah monospesifik sehingga dapat untuk uji koaglutinasi. Adanya agglutinas antara serum kelinci dengan antigen *Escherichia coli* O157:H7 menunjukkan bahwa antibodi telah terbentuk. Sensitifitas dan spesifisitas metode koaglutinasi pernah dilaporkan setara dengan uji ELISA (Supar, 1996, Murray, 1987). Reagen koaglutinasi dapat disimpan dalam lemari es selama beberapa minggu atau beberapa bulan untuk digunakan dalam menentukan serotipe *Escherichia coli* O157:H7. Serum monospesifik dapat disimpan dalam lemari es atau penyimpanan yang lebih lama pada suhu -20°C, akan tetapi pembekuan dan pencairan yang

berulang-ulang perlu dihindari karena mengurangi sensitifitas (Supar, 1996).

Hasil *serotyping* terhadap somatik antigen (O) dan flagella (H) dari 351 isolat *Escherichia coli* asal susu dan 30 isolat asal daging dapat dilihat pada (Tabel 1). Tabel 1 menunjukkan bahwa dari 351 isolat *Escherichia coli* asal susu terdapat dua sampel yang bereaksi positif agglutinasi terhadap antigen O157 dan H7, sedangkan dari 30 isolat *Escherichia coli* asal daging tidak terjadi reaksi agglutinasi. Hal ini menunjukkan bahwa dari 351 isolat *Escherichia coli* asal susu tidak semuanya memiliki *serotype* O157 dan H7. *Escherichia coli* O157:H7 banyak diisolasi dari susu yang belum dipasteurisasi dan ternak sapi merupakan karier pada kasus

kontaminasi pangan asal ternak (CDC, 2001). Kasus keracunan pangan asal ternak di Indonesia yang disebabkan karena *Escherichia coli* O157:H7 jarang dilaporkan, karena belum diterapkan standar analisa untuk *Escherichia coli* O157:H7 (Haryadi dan Nurailiyati, 1999).

Prevalensi *E.coli* O157:H7 dari susu di Belanda dilaporkan antara 0-10% (Heuvelink dkk, 1998) sedangkan pada susu sapi dari peternakan di Bogor, Cianjur dan Sukabumi dilaporkan 0,5% (Suwito, 2005). Kasus infeksi *E.coli* O157:H7 pada manusia di Indonesia telah dilaporkan dari Rumah Sakit Ciptomangunkusumo Jakarta dan empat dari sembilan kasus tersebut meninggal dunia (Tambunan dkk., 2001).

Tabel 1. Hasil O dan H *serotyping*

Asal Isolat	Jumlah Isolat <i>E.coli</i>	Reaksi Agglutinasi Positif		Reaksi Agglutinasi Negatif	
		Serum O157	Serum H7	Serum O157	Serum H7
Susu	351	2	2	349	349
Daging	30	-	-	30	30
Jumlah	381	2	2	379	379

Serum kebal monospesifik *E.coli* O157:H7 dengan cara absorpsi dan koagglutinasi dapat digunakan untuk deteksi *E.coli* O157:H7 dari pangan asal ternak.

Veteriner Bogor yang telah membantu selama kegiatan penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Anggaran Pendapatan Belanja Negara (APBN) tahun 2004. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua teknisi Bagian Bakteriologi di Balai Besar Penelitian

[AAPHV]. 2000. American Association of Public Health Veterinarians. Position statement on raw (unpasteurized) milk produk. Public Health Veterinarian Coalition Committee. <http://www.avma.org/aaphv/year2000.htm> [27 Juni 2000].

[CDC]. Center of Disease Control and Prevention.

Serum kebal monospesifik *E.coli* O157:H7 dengan cara absorpsi dan koagglutinasikan dapat digunakan untuk deteksi *E.coli* O157:H7 dari pangan asal ternak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Anggaran Pendapatan Belanja Negara (APBN) tahun 2004. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada semua teknisi Bagian Bakteriologi di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor yang telah membantu selama kegiatan penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- [AAPHV]. 2000. American Association of Public Health Veterinarians. Position statement on raw (unpasteurized) milk produk. Public Health Veterinarian Coalition Committee. <http://www.avma.org/aaphv/year2000.htm> [27 Juni 2000].
- [CDC]. Center of Disease Control and Prevention. 1997. Human Pathogens on the Farm. *Morb Mortal Wkly Rep* (42): 258-263.
- Chinyu, S.U., Brandt, L.J. 1995. Review *E.coli* O157:H7 Infection in Humans. *Annals of Internal Medicine* 123 (9):698-707.
- Dewi, S. 1994. Pembuatan serum kebal monospesifik dari tipe antigen *Streptococcus agalactiae*. Skripsi S₁. Institute Pertanian Bogor; 30-33.
- Herbst, H.J., Lavanchy, D., Braun, D.G. 1983. Grouping of Haemolytic *Streptococci* by Monoclonal antibodies:determinant Specificity, Cross Reactivity. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*. 134 D: 349-371.
- Honda, T., Samakoses, R., Sornchaj, C., Takeda, Y., Miwatani, T. 1983. Detection by Staphylococcal coagglutination test of heat labile enterotoxin producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 17:592-595.
- Heuvelink, A.E., Bleumink, B., Biggelaar, F.L.A.M., Giffel, M.C., Beumer, R.R., Boer, E.D. 1998. Occurrence and Survival of verocytotoxin producing *E.coli* O157 in Raw Cow's milk in the Netherland. *J food Prot* 61(12):1597-1601.
- Haryadi, R.D., Nurailyasti. 1999. Skrining *Escherichia coli* O157:H7 pada isolat *E.coli* lokal dengan menggunakan uji aglutinasi. Proceeding Seminar Nasional Teknologi Pangan. Jakarta, 12-13 Oktober: 364-376.
- Malole, M.B.M, Pramono, C.S.U. 1989. Penggunaan hewan-hewan Percobaan di Laboratorium. Departemen Pendidikan Dan kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Murray, C.J. 1987. Detection of K88, K99 fimbrial antigens on *Escherichia coli* by coagglutination. *Aust. Vet. J.* 64:39-40
- Pasaribu, F.H., Lammler, C.H., Blobel, H. 1985. Serotyping of Bovine and human Group B *Streptococci* by Coagglutination. *IRCS. Med. Sci.* 13:24-25.
- [SCIEH]. Scottish Center For Infection and Environmental Health. 2001. Task Force on *E.coli* O157. <http://www.foodstandards.gov.uk/multimedia/pdfs/ecolitaskfinreport>. [27 Juni 2004].
- Sokja, W.J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animal and poultry common wealth agricultural bureau of animal health. Weybridge. *Ed. rev series no* 7:205-212.
- Supar. 1985. Detection *E.coli* K88 dan K99 dengan cara koagglutinasikan. Petunjuk laboratorium Balitvet. Bogor.
- Sofyan, R. 1992. Produksi Antibodi klon Tunggal Aplikasinya dalam bidang Kedokteran Nuklir. Cermin Dunia Kedokteran. PT. Kalbe Farma. Jakarta.
- Supar. 1996. Studi kolibasilosis pada anak sapi perah